

Diss. ETH Nr. 13816

Die Rolle der Adhäsionsproteine im Redifferenzierungsprozess von
adulten Rattenkardiomyozyten in Langzeitkultur

Abhandlung zur Erlangung des Titels eines Doktors der
Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich

vorgelegt von Christian Zuppinger
Dipl. Biologe Universität Zürich
geboren am 4. Mai 1968
von Winterthur (ZH)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Hans. M. Eppenberger, Referent
Prof. Dr. Marcus C. Schaub
Prof. Dr. Ulrich Suter

2000

Zusammenfassung

Kardiomyozyten, die für die Kraftentwicklung im Herzmuskel verantwortlichen Muskelzellen, sind mittels einer speziellen Form von Zell-Zell-Kontakten miteinander verbunden, den sogenannten Glanzstreifen oder Intercalated Discs (ID). Die ID ist eine auf die Verankerung der Zellen spezialisierte Struktur, ohne die keine mechanische Energie im Gewebe erzeugt werden **kann**, und das Herz seine hauptsächliche Funktion als Pumpe des Blutkreislaufs nicht erfüllen **kann**. Diese Kontakte enthalten hauptsächlich drei Typen von Junctions: Desmosomen, Adherens- und Gap Junctions. **Adulte Ratten-Kardiomyozyten (ARC)** in Kultur zeigen eine Reihe von morphologischen Veränderungen, die von der stabförmigen Morphologie im Gewebe zu einem ausgebreiteten, polymorphen Phänotyp von kontrahierenden Zellen in der Zehkultur **führt**. Adherens und Gap Junctions sowie Desmosomen erscheinen an den neugebildeten, ID-ähnlichen **Zell-Zellkontakten**. Das **Zellkulturmodell** ist deshalb gut geeignet, die Entstehung von ID-ähnlichen Zehkontakten zu studieren. Gleichzeitig **kann** das Potenzial der isolierten adulten Kardiomyozyten hinsichtlich der **Redifferenzierung** des Zytoskeletts und der Anpassung der **Zellverankerung** in einer artifiziellen Umgebung erforscht werden. Diese Informationen werden dann wichtig, **wenn** man an eine **autologe** Transplantation von Kardiomyozyten mit Hilfe einer biokompatiblen Matrix als zukünftige Therapiestrategie denkt. Ein Protein der Adherens Junctions, N-Cadherin, ist ein Kalzium-abhängiges, transmembranes Adhäsionsprotein, das eine homotypische Adhäsionsfunktion erfüllt. Um dynamische Veränderungen während der Entstehung der Zellkontakte in lebenden Zellen zu verfolgen, wurde ein C-terminales Fusionsprotein bestehend aus N-Cadherin und dem "green fluorescent **protein**" (GFP) Reporterprotein entwickelt. Die Expression des Fusionsproteins nach der Mikroinjektion in ARC zeigte eine fluoreszierende Markierung der Zellkontakte zur Folge, ohne dass offensichtliche negative Auswirkungen auf die Struktur oder das Schlagen der Zellen aufgetreten waren. Die Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem endogenen N-Cadherin, mit Plakoglobin oder cr-Aktinin konnte mittels immunhistochemischem Nachweis gezeigt werden. Isolierte ARC wurden mit dem **Expressionskonstrukt** während des Ausbreitens der Zellen in einer frühen Phase der Kultur mikroinjiziert und die Fluoreszenzsignale wurden während der Kontaktaufnahme und in vollständig **redifferenzierten** Zellen verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass viele neue Kontaktstellen mittels feiner zellularen Bildungen etabliert wurden, die eine **ähnliche** Ultrastruktur wie die sogenannten "**Microspikes**" aufwiesen und denen möglicherweise eine Rolle während der Substraterkundung in der Ausbreitungsphase zukommt. Die ersten Kontaktstellen verbreiterten sich und verschmolzen im weiteren Verlauf lateral mit weiteren Kontaktstellen und bildeten

schliesslich eine geschlossene Linie ID-ähnlicher Strukturen. N-Cadherin-EGFP war dabei jeweils entlang des entstehenden Kontaktes nachweisbar. Die initialen Kontaktstellen dienten auch als bevorzugte Verankerungspunkte für **Aktin-Stressfasern**. Fluoreszierende Partikel schienen von der **perinukleären** Region auszugehen und zeigten ein Bewegungsverhalten, das möglicherweise auf einen Zytoskelett basierenden Transportmechanismus hindeutet. Das Fusionsprotein verschwand von den Zellkontakten, nachdem die **extrazelluläre** Kalzium-Konzentration reduziert worden war, und erschien wiederum an den ID-ähnlichen Strukturen nachdem die **Kalzium-Konzentration** wieder auf die üblichen Werte eingestellt wurde. Damit konnte demonstriert werden, dass das Fusionsprotein ebenso von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig war wie N-Cadherin ohne Reporterprotein. Das Fusionsprotein erschien vor dem Gap Junction-Protein Connexin-43 an den neugebildeten **Zell-Zell-Kontakten**. Ultrastrukturelle Untersuchungen von neugeformten Zellkontakten bestätigten diesen Befund. Diese Beobachtung trägt weiterhin zur Vermutung bei, dass die auf N-Cadherin basierende Zehadhäsion einen verstärkenden Effekt auf das **Andocken** von Connexon-Halbkanälen hat, was schliesslich zur Bildung von Gap Junction-Plaques beiträgt. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten die Existenz von autotypischen Zellkontaktstrukturen an zellulären Fortsätzen. **Membran-Invaginationen** an der, dem Substrat zugewandten, Oberfläche der Kardiomyozyten sind vermutlich der Grund für das Erscheinen, ausserhalb der ID-ähnlichen Strukturen, von streifenförmigen Signalen von N-Cadherin und anderen Proteinen der Adherens Junctions in den kultivierten Kardiomyozyten. Aufgrund der stark gefalteten Gap Junction **Plaques**, die mit ringförmigen Degradationsprodukten dieser Junctions in der Kultur auftraten, kann man eine Rolle der Kontraktion der Zellen bei der Bildung dieser Zerfallsprodukte annehmen. Der Vergleich der Morphologie der ID im adulten und embryonalen Gewebe mit den ID-ähnlichen Strukturen in der Kultur zeigte ein weites Spektrum von Zellkontaktstrukturen in verschiedenen Entwicklungsstadien, welche weitgehend von der Insertion von kontraktile Filamenten abhängig zu sein schienen. Die vorliegenden Resultate in ihrer Gesamtheit tragen zum Verständnis der Mechanismen der Entstehung von Zellkontaktstrukturen in kultivierten adulten Kardiomyozyten bei, sicherlich eine der Grundvoraussetzungen **für** jede zukünftige Implantationstechnologie.

Summary

Cardiomyocytes, the working **heart muscle** cells, are connected by typical cell-cell contacts termed intercalated discs (ID). The ID is a structure specialized for a strong anchorage of the cardiomyocytes as well as for the **exchange** of **certain** molecules and electrical potential. Without these junctions no mechanical **energy** could be **generated** and the **heart** could not **perform** its main **function** as a pump for circulation. These contacts **comprise** mainly three **distinct** junctions: desmosomes, adherens and gap junctions. **Adult** rat cardiomyocytes (ARC) in culture undergo a sequence of **morphological changes starting** from a rod-shaped form and **resulting** in a nearly confluent **layer** of polymorphic contracting cells. **Adherens** junctions and desmosomes as well as gap junctions appear at newly formed ID-like cell-cell contacts. Therefore the ARC-cultures **can serve** as an **excellent** model to study the development of **cell-cell** contacts in isolated cardiomyocytes. At the same time, the potential of isolated adult cardiomyocytes **to** redifferentiate their cytoskeleton and **cell** anchorage in an **artificial** environment **can** be studied in culture. The **knowledge on** these issues **becomes** important if one envisages a future **therapeutic** strategy involving **autologous** cardiomyocyte transplantation **using** biocompatible **matrices**. N-cadherin is a Calcium-dependent transmembrane adhesion **protein, which mediates** homophilic adhesion in adherens junctions of cardiomyocytes. In order to follow **protein** transport and **dynamic** events **during** the formation and strengthening of adherens junctions, we developed a C-terminal fusion **protein** of **chicken** N-cadherin and the **green fluorescent protein (GFP)** reporter. N-cadherin-GFP expression **after** microinjection in ARC resulted in fluorescent labeling of cell-cell contacts without negative **effect** on the **structural** integrity or beating of the cells. Colocalization with endogenous N-cadherin, plakoglobin and alpha-actinin was seen in immunostained cells. Isolated ARC were microinjected with the expression construct at the onset of spreading in culture and the fluorescence **Signals were traced during** contact formation and in fully redifferentiated living cells. Many of the **first** contact sites were **found to be** established by cellular protrusions, **which** were marked by an ultrastructure similar to **microspikes** and probably have a **role** as exploratory units in the spreading **phase**. These sites then **became laterally** enlarged and fused with adjacent contacts **during** maturation of the ID-like structures. N-cadherin-GFP was detected in a continuous **pattern along the newly formed** contact line. First contacts served as preferred anchorage sites for **actin** stress **fibers**. Fluorescent **particles** emanated from the perinuclear **region** and showed a saltatory motile behaviour. The fusion **protein** disappeared from the **cell** contacts upon Calcium-depletion and was redistributed **after regeneration, demonstrating** the Calcium-sensitivity of cadherins. N-cadherin-GFP preceded connexin-43 at **newly formed** cell-cell contacts. **Ultrastructural** data of early cell-cell contacts confirmed this **finding**. This Observation gives **further evidence** for an enhancing **role** of

N-cadherin in the **docking** process of connexin-hemichannels which may **lead** then to gap junction **plaque** formation. **Ultrastructural analysis** of junctional structures revealed **autotypic** adhesive junctions at cellular protrusions. Membrane invaginations at the sarcolemma **facing** the substratum of cultured ARC may be responsible for the appearance away from ID-like structures of a striped **pattern** of N-cadherin and other adherens junction Proteins. The appearance of folded gap junction **plaques** in vicinity of **annular** gap junction **profiles** in cultured cardiomyocytes led to the hypothesis, that such degradation **products** may appear **because** of the contracting motion of cell-cell contacts. The comparison of the morphology of ID in the adult and **embryonic** tissue with the ID-like structures in culture revealed, that the contacts in culture show a wide **spectrum** of differentiation which is in turn depending on the insertion of contractile **filaments**. These results **contribute** to the **understanding** of the **mechanisms** of cell-cell contact formation in cultured adult cardiomyocytes, certainly a **prerequisite** for any **future** implantation **technology**.